

# Importancia del método estadístico para el cálculo de la $CE_{50}$ y $CE_{95}$ de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kühn

Importance of the statistical method applied to calculate the  $EC_{50}$  and  $EC_{95}$  of some isothiocyanates evaluated against *Rhizoctonia solani* Kühn

Luis Federico Molina-Vargas<sup>1,3</sup> y Sandra Esperanza Melo-Martínez<sup>2</sup>

## RESUMEN

En el marco de la evaluación del efecto de algunos isotiocianatos (ITC) sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* Kühn, la presente investigación establece también si el método estadístico utilizado determina diferencias considerables en los valores de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y la concentración efectiva 95 ( $CE_{95}$ ) de estos compuestos. Para ello se realizó un experimento *in vitro*, y se estimaron dichos valores mediante regresiones lineales y no lineales. Los compuestos evaluados contra *R. solani* AG-3 fueron: alil isotiocianato (AITC), bencil isotiocianato (BITC), fenil isotiocianato (PITC), fenetil isotiocianato (PEITC) y metil isotiocianato (MITC). El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Manteniendo agitación constante, se prepararon diluciones de los ITC utilizando metanol como solvente, para obtener las concentraciones 0,0; 0,01; 0,1; 1,0 y 10,0%, que correspondieron a los distintos tratamientos evaluados. En cada uno de ellos se agregaron 50 mL de una de estas soluciones a las unidades experimentales, consistentes en cajas de petri con medio PDA y micelio de *R. solani* AG-3, selladas herméticamente y almacenadas a temperatura ambiente. Pasadas 72 y 144 horas después de la aplicación de los tratamientos (hdt), se tomaron fotografías digitales para calcular el área de crecimiento micelial con el software MapMaker<sup>®</sup> 3.5. Esto permitió obtener la Concentración Efectiva Media ( $CE_{50}$ ) y la Concentración Efectiva 95 ( $CE_{95}$ ) mediante regresiones lineales, no lineales (modelos Gompertz, logístico y polinómico) y análisis Probit. Los valores obtenidos a partir de este último distan bastante de lo observado, que a su vez coincide con los valores encontrados por regresión lineal. A la concentración del 10%, todos los ITC, excepto PEITC, mostraron un efecto inhibitorio total. Por su parte, BITC mantuvo su efecto fungistático hasta 21 días después de aplicados los tratamientos, mientras que PITC, AITC y MITC mantuvieron un efecto fungistático más prolongado, inclusive hasta un año después de iniciados los tratamientos.

**Palabras clave:** Gompertz, logístico, polinómico, Probit, regresiones.

## ABSTRACT

Framed in the evaluation of the effect of some isothiocyanates (ITC) on the growth of *Rhizoctonia solani* Kühn, the present research also studied whether the applied statistical method determines significant differences in the values of the Median ( $EC_{50}$ ) and 95 ( $EC_{95}$ ) effective concentrations of these compounds. For this purpose, we conducted an *in vitro* experiment in which said values were calculated by different statistical methods. *In vitro* efficacy against *R. solani* AG-3 was tested of allyl isothiocyanate (AITC), benzyl isothiocyanate (BITC), phenyl isothiocyanate (PITC), phenethyl isothiocyanate (PEITC) and methyl isothiocyanate (MITC). Under constant shaking we prepared stock solutions by mixing ITC with methanol as solvent, to get concentrations of 0.0, 0.01, 0.1, 1.0, and 10%, corresponding to the different studied treatments; each of which consisted in the addition of 50 mL of one of these solutions to the experimental units. The latter were Petri dishes containing potato-dextrose-agar medium (PDA) and mycelium of *R. solani* AG-3. These containers were then sealed with two layers of parafilm and incubated at room temperature. Digital pictures were taken to obtain the colony areas using MapMaker 3.5<sup>®</sup> software, 72 and 144 hours after the treatments were applied. The Median ( $EC_{50}$ ) and 95 ( $EC_{95}$ ) effective concentrations were calculated through linear and non-linear (Gompertz, logistic, and polynomial models) regressions, as well as probit analysis. The values obtained through the latter were found to be considerably different from the actual ones, which in turn coincided with those found by means of linear regressions. All of ITC at 10% concentration were completely inhibitory, with the exception of PEITC. Whereas BITC was fungistatic up to twenty one days after the treatments were applied, PITC, AITC, and MITC had a longer fungistatic effect, even one year after treatment application.

**Key words:** Gompertz, logistic, polinomic, Probit, regressions.

Fecha de recepción: 25 de septiembre de 2009. Aceptado para publicación: 28 de julio de 2010

<sup>1</sup> Departamento de Investigación, Buenas Prácticas Agrícolas - BPA Ltda., Bogotá (Colombia).

<sup>2</sup> Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

<sup>3</sup> Autor de correspondencia. lufemol@yahoo.com

## Introducción

Se ha generalizado el uso del método Probit para el cálculo de la  $CE_{50}$ , independientemente de si la variable respuesta se trata de una variable discreta o de una variable continua. Esa generalización ha sido errónea, posiblemente debido al desconocimiento de los experimentadores sobre el uso apropiado del análisis (Molina, 2008). Jones *et al.* (1987) utilizan el análisis Probit para calcular la  $CE_{50}$  de benomil y propiconazol para el control de *R. solani* a partir de la inhibición del crecimiento, midiendo como variable respuesta el diámetro de la colonia. Timmer *et al.* (1998) calculan el diámetro de las colonias de *Phytophthora nicotianae*, y establecen para cada concentración de fungicida evaluado, el área de la colonia expresada como el porcentaje de los tratamientos control (sin fungicida); igualmente grafican los valores de los porcentajes como probits *versus* la concentración de fungicida, en  $\log_{10}$ , pero analizan los datos mediante regresión lineal. Dobson (2002) afirma que el método del análisis estadístico depende de la escala de medida de la variable respuesta y de la variable independiente, y recomienda el uso de regresiones cuando la variable respuesta es una variable continua.

Para la estimación de la concentración efectiva (CE) que causa cierto porcentaje de inhibición en pruebas de toxicidad microbiales, los modelos de regresión lineales han sido recomendados sobre otros modelos convencionales como Probit o Logit (Madhavi *et al.*, 1995). Los análisis de regresión de mínimos cuadrados ordinarios son apropiados desde ciertos supuestos, como el de que la variable dependiente es una variable continua (Spector y Mazzeo, 1980). Las regresiones lineales se utilizan para calcular la  $CE_{50}$ , para variables respuesta medidas en porcentaje, en diferentes tipos de experimentos (Afek y Szejnberg, 1989; Baldrian y Gabriel, 2002; Huang y Mau, 2006; Huang y Mau, 2007; Kinay *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Li y Xiao, 2008; Ma y Chen, 2005; Madhavi *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2009; Ritchie *et al.*, 2001; Timmer *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008).

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar un método que permita evaluar la eficacia *in vitro* de los isotiocianatos (ITC) contra *Rhizoctonia solani* Kühn, utilizando la inhibición del crecimiento micelial. Mediante curvas de dosis-respuesta se calcularon los valores de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y la concentración efectiva 95 ( $CE_{95}$ ), por diferentes métodos estadísticos y se compararon con los valores obtenidos mediante el análisis Probit.

## Materiales y métodos

En el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, se realizó un experimento *in vitro*, en cámara de flujo laminar y cámara de extracción de gases, para evaluar la eficacia de cinco ITC contra un aislamiento AG-3 de la colección de *R. solani* Kühn de dicho laboratorio. Como medio de cultivo se utilizó Papa Dextrosa Agar (PDA) al 3,9%, en cajas de petri de 9 cm de diámetro. Con un sacabocado manual, se abrieron huecos (bolsillos) de un  $cm^2$  de área en el medio solidificado, al borde de las paredes de la caja de petri. En el extremo diametralmente opuesto al bolsillo, se colocó como inóculo un disco de micelio recortado de los bordes de colonias proveniente de cultivo del hongo de 5 d de sembrado. Los ITC evaluados fueron alil isotiocianato (AITC) al 93%, bencil isotiocianato (BITC) al 98%, fenil isotiocianato (PITC) al 99%, fenetil isotiocianato (PEITC) al 99%, obtenidos de Sigma Aldrich y metil isotiocianato (MITC) como testigo comercial, producto de la degradación del ingrediente activo dazomet (NRA, 1997; Crnogorac y Schwack, 2009) al 98% del producto Basamid® (BASF). Se utilizó metanol como solvente (Petersen *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002) al 99,9% (JTBaker). Las soluciones stock para cada ITC se prepararon agregando 100 mL de metanol a 100 mL del respectivo ITC, manteniendo en agitación constante a 500 rpm. Para cada ITC, las diluciones de 0,0; 0,01; 0,1; 1,0 y 10,0% (equivalente a 0, 100, 1.000, 10.000 y 100.000  $mg\ kg^{-1}$ , respectivamente) se prepararon agregando a muestras de la solución stock agua destilada estéril y metanol, manteniendo en agitación constante. Para evaluar el efecto del solvente, se obtuvo la concentración más alta, a la cual no se observó ningún efecto (NOEL, de su sigla en inglés: *no-observed effect level*) (Fukushima *et al.*, 2005), tanto a las 72 horas después de aplicados los tratamientos (hdt) como a las 144 hdt, comparando las áreas de crecimiento micelial mediante las pruebas de Dunnett y de Tukey. Se determinó utilizar una solución de agua con metanol como solvente, en una concentración al 20% (relación 80:20), previa verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas, bajo un nivel de significancia del 0,05. En los bolsillos abiertos en medios solidificados de PDA, se agregaron 50 mL de la respectiva dilución para cada tratamiento. Los testigos absolutos recibieron una cantidad de solvente equivalente a la usada en los tratamientos con ITC (solución de agua destilada estéril y metanol, en una relación 80:20). Las cajas de petri se cubrieron con doble capa de papel parafilm (Chung *et al.*, 2002) y se incubaron a temperatura ambiente durante siete días, en cajas de cartón en campana de extracción de gases. El experimento se repitió tres veces.

Como variable respuesta se calculó el porcentaje de inhibición, con base en el área de crecimiento micelial. Se tomaron fotografías digitales a las 72 y a las 144 hdt y se calcularon las áreas (en cm<sup>2</sup>), con las herramientas “Polygon” y “Measurement: Flood-fill area measurer” del software MapMaker® (Map Maker Ltd, Argyll, UK). Al área de crecimiento micelial de cada tratamiento se le restó el área correspondiente al disco de inóculo y se calculó la reducción relativa del crecimiento (RRC) sugerida por Taylor *et al.* (2002). La variable respuesta RRC (porcentaje de inhibición) fue determinada mediante (1).

$$\left[ 100 - \left( \frac{\text{área de crecimiento con ITC}}{\text{área de crecimiento de tratamientos control}} \right) \times 100 \right] \quad (1)$$

## Análisis estadístico

Mediante regresiones lineales y los modelos Gompertz, logístico y polinómico (regresiones no lineales) se estableció la relación entre la concentración de ITC ( $x$ ) con el porcentaje de inhibición ( $y$ ) y se obtuvieron las respectivas ecuaciones. Con dichas ecuaciones se calcularon los valores de la CE<sub>50</sub> y CE<sub>95</sub>, y se compararon con los valores obtenidos mediante el análisis Probit. Los análisis estadísticos se realizaron mediante los procedimientos Means, Univariate, Reg, Glm, Nlin y Probit del paquete estadístico SAS (*Statistical Analysis System*) v. 9.0. (SAS Institute, Inc. Cary, NC). La CE<sub>50</sub> hace referencia a la concentración de un componente anti-fúngico que es requerida para inhibir el 50% del crecimiento del hongo (Taylor *et al.*, 2002; Li y Xiao, 2008). Se conoce también como IC50 (de su sigla en inglés: *inhibit concentration 50%*) (Koenraad *et al.*, 2001) o ED50 (de su sigla en inglés: *effective dosis 50*) (Baldrian y Gabriel, 2002), y se constituye en la variable utilizada para evaluar la sensibilidad de *R. solani* a diferentes fungicidas midiendo el diámetro del micelio de la colonia (Martin *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1987; Carling *et al.*, 1990; Hajieghrari *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007) y para evaluar la eficacia de fungicidas fumigantes (Hutchinson *et al.*, 2000).

Cada ITC se evaluó con un diseño experimental de bloques completamente aleatorizado (DBCA), siendo las concentraciones al 0,0; 0,01; 0,1; 1,0 y 10,0% el factor de clasificación, y la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales se hizo en forma aleatoria (aleatorización irrestricta) (Melo *et al.*, 2007). Los bloques correspondieron a las tres repeticiones del experimento en las mismas condiciones. Las unidades experimentales fueron cajas de petri, con medio PDA al 3,9%, con discos de micelio de *R. solani* AG-3 de 5 d de sembrado. El modelo lineal, para cada ITC, con cinco réplicas por tratamiento, fue (2).

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + e_{ijk} \quad (2)$$

donde:

$y_{ijk}$ :	área de crecimiento micelial promedio,
$\mu$ :	efecto media general,
$\tau_i$ :	efecto de la $i$ -ésima concentración, $i = 1, \dots, 5$
$\beta_j$ :	efecto del $j$ -ésimo bloque (experimento), $j = 1, 2 \text{ y } 3$
$e_{ijk}$ :	efecto del error experimental,
$k =$	1, ..., 5 ( réplicas)

## Cálculo de la concentración efectiva (CE)

Los parámetros para las ecuaciones fueron obtenidos mediante el procedimiento Reg para las regresiones lineales y el procedimiento Nlin para los modelos Gompertz, logístico y polinómico. Para obtener los valores de la CE<sub>50</sub>, correspondiente a la concentración de ITC que inhibe el crecimiento del micelio en un 50%, se reemplazó el valor “50” en las ecuaciones resultantes. Para todos los ITC, se obtuvo el valor  $x = CE_{50}$ , cuando  $y = 0,5$  (Sholberg *et al.*, 2003), despejando las ecuaciones de las regresiones lineales y los modelos Gompertz y logístico, con Excel de Microsoft Office Word 2007 (Microsoft Corporation, Washington, USA) y las ecuaciones polinómicas con el software Equation Wizard 1.2 (ElasticLogic, <http://www.elasticlogic.com/>). La salida Probit en SAS arrojó directamente los valores de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), valores que para efectos de este trabajo se asumieron como equivalentes a la CE<sub>50</sub>. De la misma manera se calcularon los valores de la CE<sub>95</sub>. Se compararon los datos obtenidos en las evaluaciones a las 72 y a las 144 hdt, con el fin de determinar el mejor momento para la evaluación y verificar si los datos se mantuvieron al final del experimento (Smolinska *et al.*, 2003).

Se obtuvieron el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el margen de error y el factor de precisión como pruebas de bondad de ajuste. El margen de error indica, cuanto en promedio, un modelo predice por encima (>1) o por debajo (<1) de los datos observados, y el factor de precisión indica en cuanto las predicciones difieren de los datos observados. Tanto el margen de error como el factor de precisión se calcularon mediante las fórmulas propuestas por Zhao *et al.* (2001):

$$\text{Margen de error} = 10 \frac{1}{n} \sum \log_{10} \left( \frac{\text{valores predichos}}{\text{valores observados}} \right) \quad (3)$$

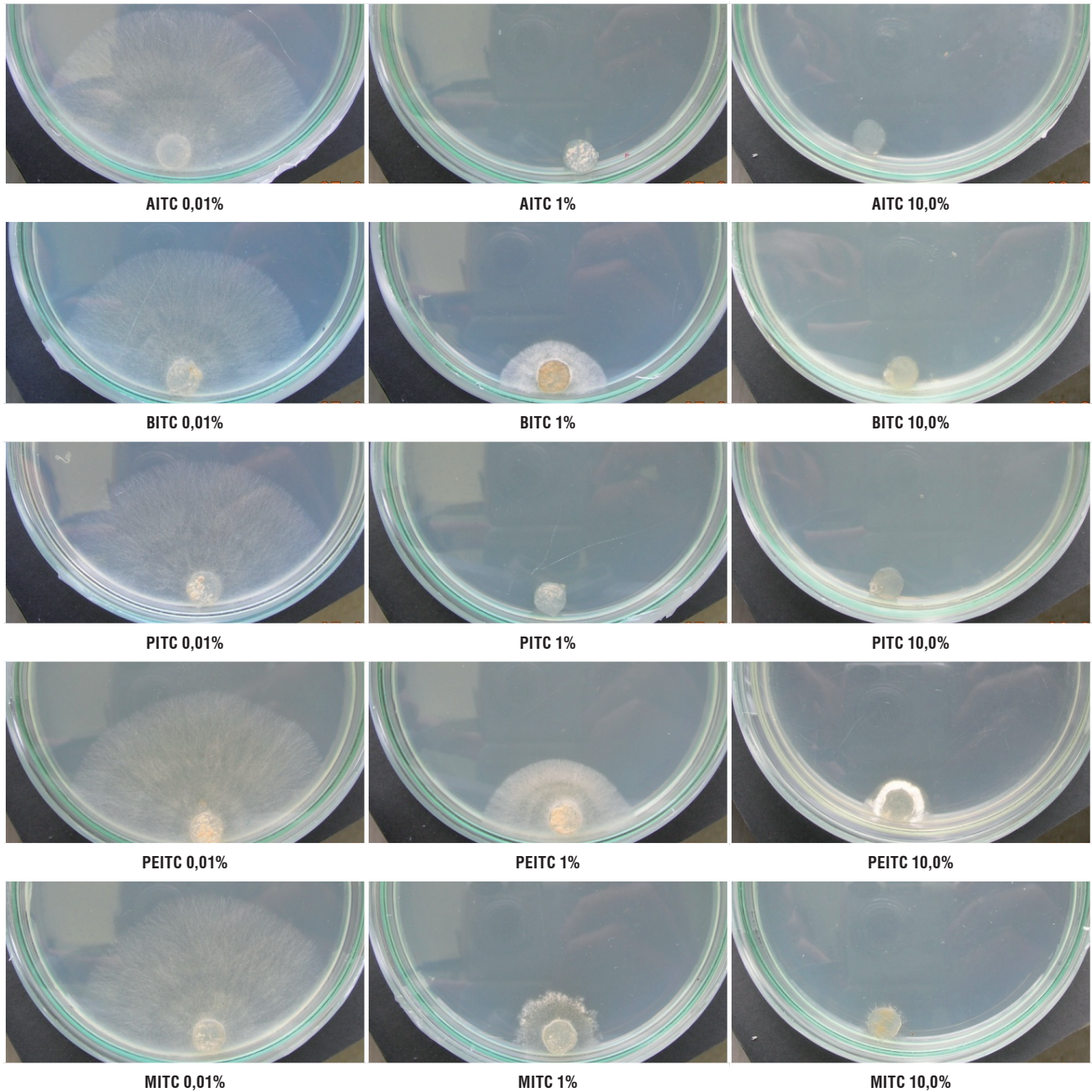
$$\text{Factor de precisión} = 10 \frac{1}{n} \sum \left| \log_{10} \left( \frac{\text{valores predichos}}{\text{valores observados}} \right) \right| \quad (4)$$

En las dos ecuaciones anteriores,  $n$  es el número de observaciones usadas en los cálculos. En un modelo perfecto,

tanto el margen de error como el factor de precisión son iguales a 1 (Zhao *et al.*, 2001). Los  $r^2$  se calcularon como la relación entre la suma de cuadrados del modelo dividido por la suma de cuadrados total, para todos los modelos, excepto regresiones lineales ( $r^2$  ajustado). Para el modelo Probit, se calculó el estadístico de Pearson ( $\chi^2$ ).

## Resultados y discusión

Los ITC evaluados presentaron efecto inhibitorio dependiente de la concentración. Todos los ITC en concentración al 10%, excepto PEITC, produjeron un efecto inhibitorio total, tanto a las 72 hdt como a las 144 hdt. Sin embargo,



**FIGURA 1.** Aspecto general del efecto inhibitorio de los ITC. La inhibición completa del micelio se dio con AITC y PITC al 1,0 % y todos los ITC al 10%, excepto PEITC (72 hdt).

en las unidades experimentales sometidas a BITC al 10%, después de 28 hdt se observó crecimiento de micelio, lo que evidencia un efecto fungistático a dicha concentración (Fig. 1). AITC, PITC y MITC en concentración al 10% mostraron un efecto fungistático más prolongado, que duró incluso hasta un año después de aplicados los tratamientos. AITC y PITC, en concentración al 1%, produjeron completa inhibición a las 72 hdt (Fig. 1) pero con efecto fungistático evidenciado al cabo de 144 hdt. Este trabajo confirma los reportes de Chung *et al.* (2002), Dhingra *et al.* (2004) y Kirkegaard *et al.* (1996) en relación con la alta toxicidad de AITC contra *R. solani*.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Sarwar *et al.* (1998), sobre la sensibilidad *in vitro* de *R. solani* a MITC y BITC, entre otros ITC, mediante la reducción del crecimiento micelial, siendo los ITC aromáticos menos tóxicos por su volatilidad (PEITC y BITC son ITC aromáticos). Por otra parte, el efecto de los ITC fue superior al del fumigante sintético a base de MITC (dazomed: Basamid®), lo que corrobora los resultados de Sarwar *et al.* (1998) y Kirkegaard *et al.* (1996), quienes trabajaron con ITC liberados de GSL provenientes de tejidos de plantas Brassicaceae.

**TABLA 1.** Ecuaciones finales de los modelos a las 72 hdt.

ITC	Modelo	Ecuación	$r^2$	Margen de error	Factor de precisión
AITC	Gompertz	$y = 97,7742e^{-3,8836e^{-16,6815x}}$	0,959	1,265	1,433
	Logístico	$y = 78,8039(1+e^{(-4,8439x)})^{-1}$	0,803	1,697	1,804
	Polinómico	$y = 0,6398 + 505,5x - 450,7x^2 + 40,1118x^3$	0,908	1,200	1,446
	R. Lineal	$y = 2,4933 + 7,5863x$	0,625	0,804	1,796
BITC	Gompertz	$y = 97,7747e^{-73,7879e^{-115x}}$	0,646	-7,091	7,372
	Logístico	$y = 71,3514(1+e^{(-3,1119x)})^{-1}$	0,813	1,032	1,118
	Polinómico	$y = 4,6332 + 250,1x - 193,5x^2 + 16,9452x^3$	0,958	0,721	0,841
	R. Lineal	$y = 2,6624 + 6,3322x$	0,708	0,179	1,206
PITC	Gompertz	$y = 99,9584e^{-3,4177e^{-22,5857x}}$	0,949	0,916	1,190
	Logístico	$y = 82,7085(1+e^{(-12,6228x)})^{-1}$	0,818	1,349	1,510
	Polinómico	$y = 1,5272 + 752,3x - 718,3x^2 + 64,4079x^3$	0,872	0,852	1,181
	R. Lineal	$y = 3,2642 + 7,1047x$	0,495	0,456	1,569
PEITC	Gompertz	$y = 86,6349e^{-2,8102e^{-12,8623x}}$	0,963	0,456	0,684
	Logístico	$y = 70,9044(1+e^{(-4,4684x)})^{-1}$	0,830	0,888	0,935
	Polinómico	$y = 4,1479 + 391,3x - 342,2x^2 + 30,398x^3$	0,913	0,391	0,646
	R. Lineal	$y = 3,0728 + 6,2736x$	0,638	-0,005	1,045
MITC	Gompertz	$y = 90,6108e^{-3,3649e^{-15,6285x}}$	0,907	1,403	1,528
	Logístico	$y = 73,8356(1+e^{(-4,9636x)})^{-1}$	0,773	1,757	1,877
	Polinómico	$y = 2,5235 + 458,6x - 407,7x^2 + 36,2753x^3$	0,794	1,414	1,541
	R. Lineal	$y = 2,4261 + 7,3110x$	0,577	0,879	1,823

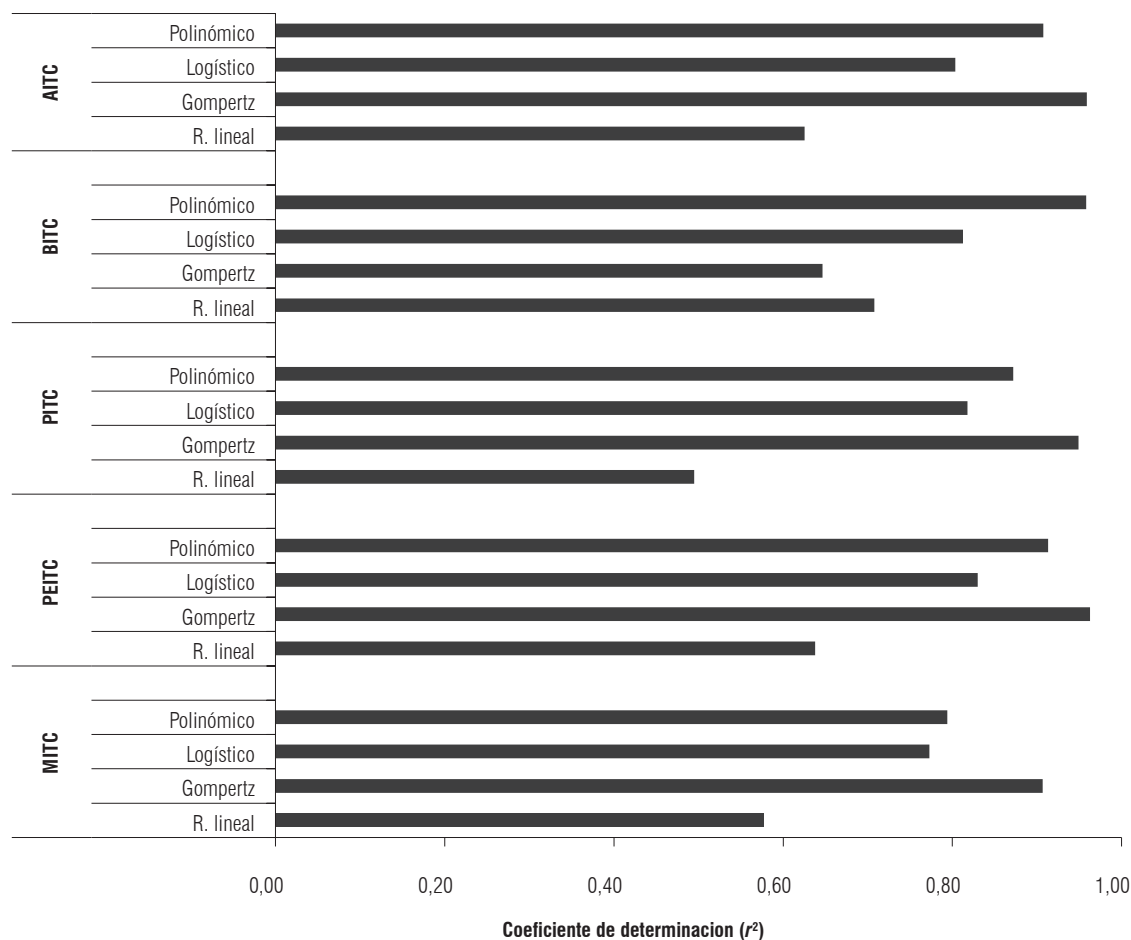


FIGURA 2. Comparación de los coeficientes de determinación. Valores del  $r^2$  para los diferentes modelos en la evaluación a las 72 hdt.

Las ecuaciones resultantes para los ITC evaluados a las 72 hdt se relacionan en la Tab. 1. Los modelos de regresión no lineal ajustaron los datos mejor que los modelos de regresión lineal, con base en los valores del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) (Sholberg *et al.*, 2003). En general, los valores más altos del  $r^2$  se obtuvieron con el modelo Gompertz, exceptuando BITC a las 72 h (Fig. 2) y PEITC a las 144 hdt, para los cuales el  $r^2$  se dio con el modelo polinómico. El modelo Gompertz fue consistente para el cálculo de la  $CE_{50}$ , lo cual concuerda con los resultados de Taylor *et al.* (2002). Los valores de la  $CE_{50}$  y  $CE_{95}$  varían considerablemente entre los valores obtenidos con los modelos de regresión no lineal y los valores obtenidos con regresiones lineales (Fig. 3), aunque los valores calculados con los modelos de regresión no lineales no difieren significativamente entre sí, corroborando lo propuesto por Sholberg *et al.* (2003), para quienes los valores de la  $CE_{50}$  calculada no difieren significativamente entre modelos. Los valores de los  $r^2$  evidenciaron una bondad de ajuste moderada (Zhao *et al.*, 2001), pues fueron superiores a 0,50 para las regresiones lineales y superiores a 0,77 para las regresiones no lineales, excepto para el modelo Gompertz de BITC, donde fue de

0,65 (Fig. 2). Todos los modelos presentaron valores para  $r^2$  mucho más altos que los obtenidos por Vargas *et al.* (2002), quienes por medio de una curva de respuesta del crecimiento del diámetro de la colonia de *R. solani* respecto a dosis de glifosato, ajustaron un modelo cuadrático semi-logarítmico de tipo  $y = a + b (\ln x)^2$ , con un  $r^2$  de tan solo 0,224 a las 72 hdt. Zhao *et al.* (2001) demostraron que la regresión logística es un mejor método que la regresión lineal para modelar porcentajes, lo cual tiene una ventaja inherente: el hacer siempre predicciones biológicamente significativas, y en la mayoría de los casos también predice valores cercanos a las observaciones. Aunque Zhao *et al.* (2001) consideran que la regresión logística y no la regresión lineal, debería ser usada cuando las observaciones son dadas en porcentajes, reconocen que, en ciertas circunstancias, los modelos lineales podrían dar una bondad de ajuste aceptable.

En general, los valores de la  $CE_{50}$  obtenidos con los modelos Gompertz, logístico y polinómico estuvieron entre los límites fiduciales de la  $CE_{50}$  obtenida con Probit, a excepción de BITC a las 72 hdt, mediante el modelo Gompertz (datos no mostrados). Los valores de la  $CE_{50}$  estimados por modelos

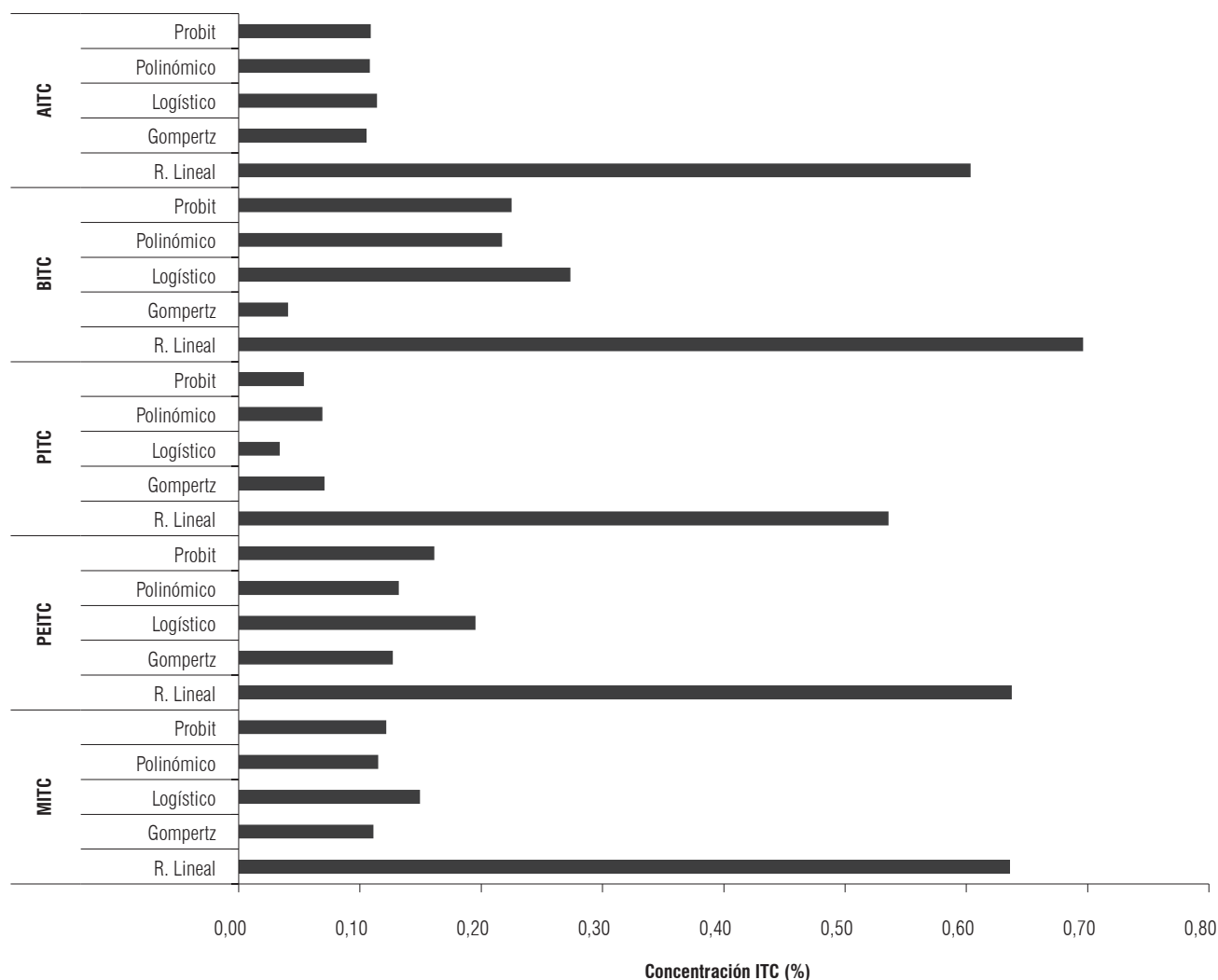
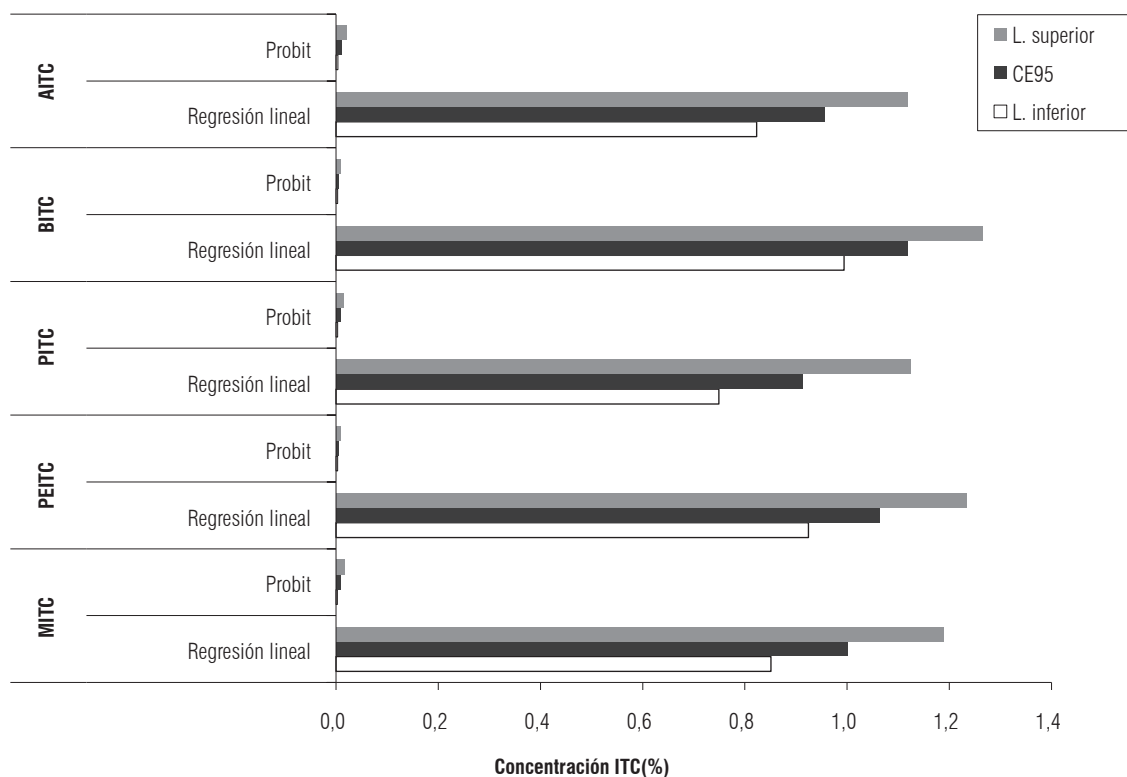


FIGURA 3.  $CE_{50}$ . Valores de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de los ITC evaluados a las 72 hdt.

de regresión lineal fueron considerablemente más altos que los valores estimados por el modelo Probit (Fig. 3). Sin embargo, al ser la variable respuesta una variable continua, en vez de una variable cuantil, el uso del modelo Probit no se recomienda (Millie y Hersh, 1987). La respuesta medida en pruebas de toxicidad microbiales es típicamente una variable continua. La teoría estadística tradicional para el tratamiento de datos cuantales (o categóricos) de pruebas con animales está basada en el concepto de distribución de tolerancia para pruebas individuales, que no es apropiada para pruebas microbiales (Nyholm *et al.*, 1992). Las variables continuas son frecuentemente modificadas en variables categóricas durante su análisis. Sin embargo, la categorización de variables continuas puede causar problemas como la pérdida de información o que esta puede ser errada. En algunas circunstancias la categorización de variables continuas puede arrojar resultados parcializados (Walraven y Hart, 2008).

El análisis Probit es una técnica comúnmente usada en ensayos biológicos para estudiar la relación de dosis-respuesta en una población de organismos biológicos (Ashford y Sowden, 1970) y describe la relación de dosis respuesta entre una variable independiente continua y una variable respuesta cuantil (por ejemplo, presencia o ausencia, vive o muere) (Gibbons y Wilcox-Gok, 1998). Estas técnicas tienen una larga historia con el término “probit” desde Bliss (1934) y Finney (1947) atribuyendo el origen de la técnica a psicólogos en los finales de los años 1800 (McCulloch, 2000). Los miembros seleccionados aleatoriamente de una población expuesta a varios niveles de un estímulo aplicado, y la acción del estímulo en un organismo particular, son evaluados en términos de la respuesta cuantil (por ejemplo, muerte o vida). El objeto principal del análisis es evaluar la relación entre el nivel del estímulo y la *probabilidad de la respuesta* (Ashford y Sowden, 1970). De hecho, Finney (1947) define la  $DE_{50}$  o  $DL_{50}$  como la dosis



**FIGURA 4.** Comparación de la  $CE_{95}$  calculada con Probit y con regresiones lineales. Se representan los límites fiduciales y los límites de confianza para Probit y las regresiones lineales, respectivamente con un 95% de confianza.

que produce una respuesta en la mitad de la población, y Bhattacharya y Kong (2007) definen la  $DE_{50}$  como el valor de una dosis  $x$ , para el cual la probabilidad  $[F(x)]$  de que un sujeto responda positivamente a esa dosis ( $x \geq 0$ ) es 0,5. Para Beck *et al.* (2000), los modelos Logit y Probit están diseñados para modelar un fenómeno de interés “ $y$ ”, que es discreto: es decir, este ocurre (para ser denotado evento “ $y$ ”) o no. En ambos modelos “ $y$ ” ocurre como una distribución Bernoulli descrita por el parámetro  $Pr(y)$ : la probabilidad que el evento ocurra.

### Concentración efectiva con Probit vs. Concentración efectiva mediante regresiones lineales

Con el fin de evidenciar las diferencias de los resultados, dependiendo del método utilizado, se compararon los valores de la  $CE_{50}$  y  $CE_{95}$  obtenidos con el análisis Probit con los valores obtenidos mediante regresiones lineales. Los valores de la  $CE_{95}$ , calculados mediante las regresiones lineales, estuvieron por fuera del límite de confianza de la  $CE_{95}$  obtenida con Probit, y fueron mucho más altos a los límites fiduciales superiores (Fig. 4). La  $CE_{95}$  obtenida con el método Probit fue de 0,01% a las 72 hdt, para todos los ITC (Fig. 4). Sin embargo, se observó completa inhibición con concentraciones de ITC cercanas al 1% (Fig. 1), por lo que es fácil, y lógico, deducir que una concentración de

ITC al 0,01%, no puede ser la concentración que inhibe el crecimiento de micelio en un 95%, en tanto que los valores de la  $CE_{95}$  obtenidos mediante las regresiones lineales fueron cercanos al 1% (Figs. 1 y 4).

Cuando los métodos estadísticos son usados en un contexto científico en donde se conoce que sus suposiciones pueden fallar y en donde hay una razonable presunción en la intención de engañar, entonces son fraudulentos (Bross, 1990). Aunque la mayoría de los métodos para análisis de ensayos de respuesta cuantal proporcionan resultados similares en la estimación de la  $DE_{50}$ , estos mismos métodos varían drásticamente para estimaciones en las regiones de la cola (Copenhaver y Mielke, 1977). Los valores de la  $CE_{95}$  (o  $CE_{50}$ ) obtenidos con un método inapropiado dan entonces como resultado el uso intencional de un método fraudulento.

### Conclusiones

- Todos los ITC evaluados presentaron efecto inhibitorio en el crecimiento de micelio, el cual fue total para AITC, BITC, PITC y MITC, en una concentración del 10%.
- *Rhizoctonia solani* AG-3 varía en su sensibilidad a los ITC. En concentraciones del 10%, los ITC aromáticos



BITC y PEITC tienen un menor efecto inhibitorio, debido a su mayor volatilidad. Los productos AITC y PITC tuvieron un efecto fungistático más prolongado, al igual que el testigo comercial MITC (Dazomet®).

- Los valores de la  $CE_{50}$  y  $CE_{95}$  difieren considerablemente, dependiendo del modelo estadístico utilizado. Para todos los ITC, la  $CE_{95}$  obtenida con Probit fue del 0,01%, valor muy diferente a los valores observados, que fueron cercanos al 1% y que coincidieron con los valores obtenidos mediante las regresiones lineales.
- Con base en la  $CE_{50}$ , se determinó que la sensibilidad de *Rhizoctonia solani* AG-3 es mayor para PITC > AITC > MITC > PEITC > BITC.

## Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en especial al señor Rubén Darío Cruz, e igualmente al ingeniero Danny Sanjuanelo, profesor de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA) por su ayuda en estadística, al profesor Enrique Torres por la oportuna y enriquecedora revisión del artículo y a Buenas Prácticas Agrícolas Ltda. (AgriculturaBPA.com), por el apoyo económico.

## Literatura citada

- Afek, U. y A. Sztejnberg. 1989. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathol.* 79, 736-739.
- Ashford, J.R. y R.R. Sowden. 1970. Multi-variate probit analysis. *Biometrics* 26(3), 535-546.
- Baldrian, P. y J. Gabriel. 2002. Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycol.* 94(3), 428-436.
- Beck, N., G. King y L. Zeng. 2000. Improving quantitative studies of international conflict: a conjecture. *Amer. Polit. Sci. Rev.* 94(1), 21-35.
- Bhattacharya, R. y M. Kong. 2007. Consistency and asymptotic normality of the estimated effective doses in bioassay. *J. Stat. Plann. Infer.* 137, 643-658.
- Bliss, C.I. 1934. The method of probits. *Sci.* 79(2037), 38-39.
- Bross, I.D. 1990. How to eradicate fraudulent statistical methods: statisticians must do science. *Biometrics* 46(4), 1213-1225.
- Carling, D., D. Helm y R. Leiner. 1990. *In vitro* sensitivity of *Rhizoctonia solani* and other multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* to selected fungicides. *Plant Dis.* 74, 860-863.
- Crnogorac, G. y W. Schwack. 2009. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trac-Trends Anal. Chem.* 28(1), 40-50.
- Copenhaver, T.W. y P.W. Mielke. 1977. Quantit analysis: a quantal assay refinement. *Biometrics* 33(1), 175-186.
- Chung, W.C., J.W. Huang, H.C. Huang y J.F. Jen. 2002. Effect of ground *Brassica* seed meal on control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage. *Can. Plant Pathol.* 24, 211-218.
- Dhingra, O.D., M.L. Costa y G.J. Silva Jr. 2004. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production. *J. Phytopathol.* 52(6), 352-357.
- Dobson, A.J. 2002. An introduction to generalized linear models. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL.
- Finney, D.J. 1947. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Finney, D.J. 1947. The estimation from individual records of the relationship between dose and quantal response. *Biometrika* 34(3-4), 320-334.
- Finney, D.J. 1947. The principles of biological assay. *J. Royal Stat. Soc.* 9(1), 46-91.
- Fukushima, S., A. Kinoshita, R. Puatanachokchai, M. Kushida, H. Wanibuchi y K. Morimura. 2005. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 26(11), 1835-1845.
- Gibbons, R.D. y V. Wilcox-Gok. 1998. Health service utilization and insurance coverage: a multivariate probit analysis. *J. Amer. Stat. Assoc.* 93(441), 63-72.
- Hajjehghrari, B., M.R. Mohammadi y D. Hadian. 2006. Antifungal activity of *Cymbopogon parkeri* stapf. essential oil on some important phytopathogenic fungi. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 71(3), 937-941.
- Huang, S.J. y J.L. Mau. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of  $\gamma$ -irradiation. *LWT-Food Sci. Technol.* 39, 707-716.
- Huang, S.J. y J.L. Mau. 2007. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Antrodia camphorata* with various doses of  $\gamma$ -irradiation. *Food Chem.* 105, 1702-1710.
- Hutchinson, C.M., M.E. Mcgiffen, H.D. Ohr, J.J. Sims y J.O. Becker. 2000. Efficacy of methyl iodide and synergy with chloropicrin for control of fungi. *Pest Manage. Sci.* 56(5), 477-490.
- Jones, R.K., S.B. Belmar y M.J. Jeger. 1987. Evaluation of benomyl and propiconazole for controlling sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Dis.* 71, 222-225.
- Jones, S., S. Pethybridge, F. Hay, T. Groom y C. Wilson. 2007. Baseline sensitivity of Australian *Phoma ligulicola* isolates from pyrethrum to azoxystrobin and difenoconazole. *J. Phytopathol.* 155(6), 377-380.
- Kinay, P., M.F. Mansour, F.M. Gabler, D.A. Margosan y J.L. Smilanick. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Prot.* 26, 647-656.
- Kirkegaard, J.A., P.T. Wong y J.M. Desmarchelier. 1996. *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathol.* 45, 593-603.
- Koenraad, F.M., B. Tierens, M.B. Thomma, S. Jurgen, K. Kistner, A. Porzel, B. Mauch-Mani, P.A. Cammue y W.F. Broekaert. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiol.* 125, 1688-1699.
- Lee, Y.L., J.H. Yang y J.L. Mau. 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chem.* 106, 1128-1137.

- Li, H.X. y C.L. Xiao. 2008. Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. *Postharv. Biol. Technol.* 47, 239-245.
- Ma, J. y J. Chen. 2005. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environ. Pollution* 136, 267-273.
- Madhavi, D.R., A. Umamaheswari y K. Venkateswarlu. 1995. Effective concentrations of nitrophenolics toward growth yield of selected microalgae and Cyanobacteria isolated from soil. *Ecotoxicol Environ. Saf.* 32, 205-208.
- Martin, S.B., L. Leon y C.L. Campbell. 1984. Comparative sensitivity of *Rhizoctonia solani* and Rhizoctonia-like fungi to selected fungicides in vitro. *Phytopathol.* 74(7), 778-781.
- McCulloch, C.E. 2000. Generalized linear models. *J. Amer. Stat. Assoc.* 95(452), 1320-1324.
- Melo, O.O., L.A. López y S.E. Melo. 2007. Pruebas de comparaciones múltiples y validación de supuestos. pp. 247 -283. En: Melo, O.O., L.A. López y S.E. Melo (eds.). *Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Millie, D.F. y C.M. Hersh. 1987. Statistical characterizations of the atrazine-induced photosynthetic inhibition of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta). *Aquatic Toxicol.* 10(4), 239-249.
- Molina, L.F. 2008. Método *in vitro* para evaluar la eficacia de los isotiocianatos contra *Rhizoctonia solani*, mediante la determinación de la Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>) calculando el área de crecimiento micelial con el *software* Mapmaker 3.5®. Tesis de maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Mu, K., X. Zhao, L. Hu, F. Zhang, W. Zhang y J. Cui. 2006. Toxicity of lanthanum to pathogenic fungi and its morphological characteristics. *J. Rare Earths* 24, 607-612.
- Muñoz, Z., A. Moret y S. Garcés. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum sp.* on tomatoes and grapes. *Crop Prot.* 28(1), 36-40.
- Nyholm, N., P.S. Sørensen, K.O. Kusk y E.R. Christensen. 1992. Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11(2), 157-167.
- NRA, National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. 1997. Report on the special review of metham sodium, dazomet and methylisothiocyanate (MITC). Series 97. 2. Tomo 2. Kingston, Australia.
- Petersen, J., R. Belz, F. Walker y K. Hurlle. 2001. Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rapeseed mulch. *Agron. J.* 93, 37-43.
- Ritchie, J.M., M. Cresser y J. Cotter-Howells. 2001. Toxicological response of a bioluminescent microbial assay to Zn, Pb and Cu in an artificial soil solution: relationship with total metal concentrations and free ion activities. *Environ. Pollution* 114, 129-136.
- Sarwar, M., J.A. Kirkegaard, P.W. Wong y J.M. Desmarchelier. 1998. Biofumigation potential of brassicas. *Plant Soil* 201, 103-112.
- Sholberg, P.L., K.E. Bedford y S. Stokes. 2003. Effect of preharvest application of cyprodinil on postharvest decay of apples caused by *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 87, 1067-1071.
- Smolinska, U., M.J. Morra, G.R. Knudsen y R.L. James. 2003. Isothiocyanates produced by brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.* 87(4), 407-412.
- Spector, L.C. y M. Mazzeo. 1980. Probit analysis and economic education. *J. Econ. Educ.* 11(2), 37-44.
- Taylor, R.J., B. Salas, G.A. Secor, V. Rivera y N.C. Gudmestad. 2002. Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (Metalaxyl). *Plant Dis.* 86(7), 797-802.
- Timmer, L.W., J.H. Graham y S.E. Zitko. 1998. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Dis.* 82(2), 254-261.
- Tseng, Y.H., J.H. Yang, H.L. Chang, Y.L. Lee y J.L. Mau. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascus adlay. *Food Chem.* 97, 375-381.
- Vargas, A., C.L. Fuentes y E. Torres-Torres. 2002. Respuesta al glifosato de un aislamiento de *Rhizoctonia solani*, agente causal del añublo de la vaina del arroz, y de cuatro aislamientos de *Trichoderma*, bajo condiciones *in vitro*. *Agron. Colomb.* 19(1-2), 43-55.
- Walraven, C. y R.G. Hart. 2008. Leave 'em alone – why continuous variables should be analyzed as such. *Neuroepidemiology* 30, 138-139.
- Witte, I., E. Frahmann y H. Jacobi. 1995. Comparison of the sensitivity of three toxicity tests determining survival, inhibition of growth and colony-forming ability in human fibroblasts after incubation with environmental chemicals. *Toxicol. Vitro* 9(3), 327-331.
- Xiao, M., J.Y. Yang, W.J. Xiao y S. Yang. 2007. Application of binding spectrum in DMIs fungicide screening. *Chin. J. Biotechnol.* 23(6), 1129-1134.
- Yang, J.H., Y.H. Tseng, Y.L. Lee y J.L. Mau. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascus rice. *LWT-Food Sci. Technol.* 39, 740-747.
- Yen, M.T., Y.H. Tseng, R.C. Li y J.L. Mau. 2007. Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT-Food Sci. Technol.* 40, 255-261.
- Yen, M.T., J.H. Yang y J. L. Mau. 2008. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polymer.* 74, 840-844.
- Zhang, L., X. Mu, J. Fu y Z. Zhou. 2007. In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicol. Vitro* 21, 734-740.
- Zhao, L., Y. Chen y D.W. Schaffner. 2001. Comparison of logistic regression and linear regression in modeling percentage data. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5), 2129-2135.
- Zhu, G., F. Huang, L. Feng, B. Qin, Y. Yang, Y. Chen y X. Lu. 2008. Sensitivities of *Phytophthora infestans* to metalaxyl, cymoxanil, and dimethomorph. *Agr. Sci. China* 7(7), 831-840.